

Streptolysin S に対する正常血清の 影響性に関する研究

第 I 項：血清の抗 Streptolysin S 作用の機序に就て

第 II 項：Streptolysin S の熱非働化に対する血清の
防禦的影響に就て

金沢大学医学部薬理学教室（主任：岡本肇教授）

宝 達 務

（受付：昭和30年8月18日）

緒 論

溶連菌の産出する溶血毒素 Streptolysin S（以下単に“S”とも略記す）による溶血に対し正常血清が抑制的効果を呈する事は、先に当研究室に於て行われた伊藤¹⁾による溶連菌の1%核酸加ブイオン培養の遠心上清液（溶血限界濃度1:20,000）を対象とした血清の影響に就ての実験、並びに大西²⁾による精製 Streptolysin S（溶血限界濃度1:10,000,000）を対象とした血清の影響の実験によつて確証*された処である³⁾が、然らば此の正常血清の抗“S”作用が果して抗原・抗体的反応のものであろうか。

この問題に関して、曾て Todd^{4), 5)}は溶連菌感染の動物或は人体には特異的免疫体即ち Antistreptolysin S が存在するとしたが、最近 Stollerman 一派^{6), 7)}並びに Humphrey^{8), 9)}は血清の抗“S”作用は特異的抗体によるものではなく、正常血清常存の成分、就中 Lipopro-

tein**に関係すると発表した。

次に此等学者研究の要点を述べれば、

1) 正常血清の Alcohol 分割に於ける Lipoprotein 分割に抗“S”作用がある、

2) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分割では Albumin 分割に抗“S”因子がある、

3) 抗“S”作用は血清の Trypsin 消化、加熱、保存で却つて増強するが、Lecithinase で減弱する、

4) すべての動物の血清には抗“S”因子が存在する、

5) “S”が抗原性であるとする確証がない、

6) Rheumatism 並びに A 群溶連菌による咽頭炎患者の血清では抗“S”力価に殆んど変動が無いが、却つて低下がある、等の如くである。

此の様に血清の抗“S”作用の研究は目下血

* 1938 年 Todd¹⁰⁾ によつて溶連菌の産出する溶血毒素には Streptolysin O (Oxygen-labile hemolysin) と Streptolysin S (Oxygen-stabile hemolysin) の二種ある事が指摘せられる以前に、Braun¹¹⁾(1912), M'Leod¹²⁾(1912), 金井¹³⁾(1920) 等によつて既に血清が溶連菌溶血毒に対して抑制作用を呈する事が溶連菌の培養濾液を以つての実験で実証されてはいるが、此等が果して“O”及び“S”の何れの毒素を対象としたものか、或は両者を対象としたものかの点は不明である。

** Stollerman⁶⁾等は Streptolysin S なる表現を避けて、Streptolysin S inhibitor と呼称する方が適切としている。

清中に於ける抗“S”因子の分離並びにその本質を追求する方向をとつていのであるが、然し今翻つてStreptolysin Sに対し如何なる機序によつて血清（或はその成分）が抑制効果を發揮するかの問題に目を転ずるならば、これ迄この事に関しては何等考究されておらず、未だ全く不明と云うの外ない現状である事に当面するのである。私は溶連菌の1%核酸加ブイオン培養液から分離した高度活性の精製 Streptolysin Sを使用して、“S”溶血に対する血清の影響関

係の考查を続ける事2ヶ年、遂に「血清の“S”溶血に対する抑制的影響は、少くとも“S”が血清によつて破壊されて無活物と化する為ではなく、血清の存在下では“S”が単に赤血球に対し作働し得ない状態に置かれているに過ぎない」事を確め得るに至ると共に、この間亦「血清が“S”の易熱性を防禦する」という新知見をも開発し得たのである。以下その成績を報告する事とする。

第 I 項：血清の抗 Streptolysin S 作用の機序に就て

実験方法

I) 精製 Streptolysin S. _____

溶連菌 (S株) の1%酵母核酸加ブイオン培養から岡本教授¹⁴⁾等の方法によつて分離した、

a) A-I-Streptolysinfrac₁ (溶血限界濃度=1:5~10 Mill., 蛋白反応陽性)

b) I_B-Streptolysinfrac₁ (即ち正印¹⁵⁾の所謂 I-N-F-Streptolysinfrac₁ に該当するもので、溶血限界濃度 1:20 Mill., 10% 水溶液でも蛋白反応陰性)

の2精製 Streptolysin S 標本を供用した。

何れも蒸留水を以つて 1:1,000 に溶解したものを原液とした。

II) 溶血力試験術式. _____

当教室に於て従来行つて来た方法に準じた。即ち Streptolysin S 原液から調製した2又は2.5倍逓下稀釈液各 1 ml に対し、1%家兎赤血球浮游液 (脱線維血

液を 0.85% 食塩水を以つて4回洗滌) 1 ml 宛を加え、振盪混和を行つてから孵電中 (37°C) に納める。2時間目に一度溶血の有無強弱如何を確め、更に22時間氷室に静置せしめて試験成績の再度判定を行つた。何れの場合に於ても溶血を起す最少濃度、即ち溶血限界濃度を以つて溶血力を示す事とした。

III) 溶血試験メジウム. _____

Streptolysin S 溶血に対する血清の影響関係を考查する事を以つて眼目とした本研究では、その目的を達すべく「メジウム」として、

1. 0.85% 食塩水

2. 健常家兎血清 (そのまゝ、或は 56°C, 60' の処置を施したもの) に同量の生理的食塩水を加えたもの、即ち [血清+生理的食塩水] aa 混液、

の2つを選び、夫々による Streptolysin S 原液の逓下稀釈を行つた。

実験成績

第1表は A-I-Streptolysinfrac₁ の 1:1,000 液を原液として、其の

[A] 0.85% 食塩水を以つてした逓下稀釈液各 1 ml に対し 1% 家兎赤血球浮游液 1 ml 宛を加えた場合、

[B] [家兎血清+0.85% 食塩水] aa 混液を以つてした逓下稀釈液各 1 ml に対し血球浮游液 1 ml 宛を加えた場合、及び

[C] 先づ [家兎血清+0.85% 食塩水] aa 混

液を以つて逓下稀釈液各 1 ml を調製し [C₁]、——此等に対し [B] の様に直ちに血球浮游液を加える事なく——此の内の [血清+食塩水] aa 混液による A-I-Streptolysinfrac₁ の 1:5,000, 1:20,000, 及び 1:100,000 液に就て、夫々を基にして今度は単なる 0.85% 食塩水を以つての逓下稀釈列を作り、此に対し血球浮游液 1 ml 宛を加えた場合 [C₂]、の三つの溶血試験を同時に行つて得た成績を示

したものである。

即ち本実験に於て注目すべき所見を摘記すると次の如くである。

1) 0.85 % 食塩水を「メジウム」とした〔A〕実験列では“S”の1: 10 Mill. の高稀釈液迄溶血が起つているに対し、

2) 〔血清+食塩水〕aa 混液を「メジウム」とした〔B〕実験列では“S”溶血が1: 50,000 ~ 100,000 液迄しか起つていない、即ち50%血清の存在で“S”の溶血力が1/200 ~ 1/100 に低下されている、及び

3) 〔C₁〕実験列で調製した〔血清+食塩水〕aa 混液中に於ける“S”濃度が夫々1: 5,000, 1: 20,000, 及び1: 100,000 のものを基とし、此の三者に就て0.85 % 食塩水を「メジウム」とする溶血試験を行つた〔C₂〕実験列では、

a) 前二者の場合には溶血限界濃度が夫々1: 10 Mill. 及び1: 5 Mill. であるという具合に最初から食塩水を「メジウム」とした〔A〕実験列に於けると殆んど同等の“S”稀釈液迄溶血が現われているが、

β) 後者にあつては“S”の稀釈濃度が1: 200,000 から1: 20 Mill. に至る迄の総ての試験管に於て全然溶血が起つていない。

而して茲に〔C₂〕実験列の〔血清+食塩水〕aa 混液中に“S”が1: 100,000 の濃度に含有するものに就て、之から食塩水による逓下稀釈液を作つて溶血試験を行つた場合——其の成績に於て〔3a〕の場合とは一見趣の異なるものがあり——“S”の最高試験濃度たる1: 200,000 液の試験管を初めとして全管に亘つて全然溶血が起つていないという事に関しては、此の場合各管に於ける血清の含量が

第1管（即ち“S”濃度= 1: 200,000）では25%,

第2管（即ち“S”濃度= 1: 500,000）では10%,

第3管（即ち“S”濃度= 1: 1,000,000）では5%,

第4管（即ち“S”濃度= 1: 2,000,000）で

は2.5%,

第5管（即ち“S”濃度= 1: 5,000,000）では1%, 及び

第6管（即ち“S”濃度= 1: 10,000,000）では0.5%, となつている事に想到するならば、各管に於ける血清の含量が丁度当該濃度の“S”に対し完全抑制効果を發揮し得る圈内にある為と推想されよう、そこでこの事を更に確めるべく、

1) 〔血清+食塩水〕aa 混液で調製した“S”の1: 100,000 液と、

2) 0.85 % 食塩水で調製した“S”の1: 100,000 液と、

の二者を原液として、夫々から食塩水を「メジウム」とする逓下稀釈液を作り、型の如く溶血試験を行つた処、第2表提示の様に、後者では“S”の1: 10 Mill. 迄溶血が起つたに対し、前者では全管陰性という、正に予想通りの成績が得られたのである。

尚以上第1及び第2表の実験では家兎血液から分離した血清そのまゝ即ち Native のものが使用されたのであるが、56°C, 60' の非働化処置を施した血清を使用した場合でも、其成績は全く同様であつた。

即ち以上の各実験の内、

(イ) 50 % 血清加食塩水を「メジウム」とした溶血試験で“S”の溶血力価が、単なる食塩水を「メジウム」とした溶血試験に於けるよりも遙かに低いという成績が得られた事は、血清には“S”溶血に対し抑制能のある事を、又

(ロ) “S”を50 % 血清加食塩水に溶解せしめたものに対し、生理的食塩水を「メジウム」とする溶血試験を行つた実験で、“S”の溶血力価に殆んど低下、減弱が招来されなかつた成績が得られた事は、“S”自体は血清に接触した事で破壊的影響を蒙らない事を、更には

(ハ) 56°C, 60' の非働化処置を施した血清を使用した場合でも、(イ) 及び(ロ) 実験何れの成績にも異変がなかつた事は補体が“S”の溶血作用並びに血清の抗“S”作用に関与するも

のでない事を、

明示するものと云えよう。然らば血清によつて“S”溶血の抑制される機序如何。

由来血清には蛋白、脂質、含水炭素、塩類等の外に 諸多の酵素類が存在する事は周知であり、又 既述の様に Stollerman^{6),7)}等が血清中の Lipoprotein が抗“S”作用に関与するとしている以上は、少くとも血清の抗“S”作用の機序に関しては、

1) “S”が酵素的影響の下に不可逆的に不活性化されるに非ざるか、

2) 酵素以外の血清成分の直接的化学的反応に基く“S”分子の破壊によるものでないか、が問題視されるのである。

然し如上の実験成績に徴するに於ては、此等の可能性は先づ以つて否定し得よう。

即ち本項の実験で、少くとも血清が“S”溶血に対して抑制的影響を呈する、が然しこの場合“S”が血清によつて破壊されて無活物と化するのではなく、血清存在の爲“S”が赤血球に対し作働し得ない状態に置かれているに過ぎない事が明かにされたと存ずる次第である。

第 II 項： Streptolysin S の熱非働化に対する血清の防禦的影響に就て

前項実験に続いて、血清存在下に於ける“S”の耐熱性の試験を行つている内、“S”は単なる食塩水中では 56°C, 60' の処置で完全に溶血性を喪失するに対し、〔血清+食塩水〕aa 混液中では 56°C, 60' の処置に対し尙強力に溶血作用を発揮する状態にあり得るという事実遭遇し

た。而も先人の文献に徴しても“S”の易熱性が血清の存在で防禦される事に関しては何等記載されて居らず、今回初めて留意された事象である事を知つたので、直ちにこの事に対する吟味考査に移つたわけである。

実験成績

第3表は A-I-Streptolysinfrac-tion を使用しての実験成績である。即ち〔正常家兎血清+0.85%食塩水〕aa 混液中に於ける“S”濃度が夫々 1: 5,000, 1: 20,000, 及び 1: 100,000 のもの〔C₁〕実験列) に対し、56°C, 60' の処置を施してから、夫々を基にして 0.85%食塩水を「メジウム」とする溶血試験を行つた〔C₂〕実験列では、

α) 前二者の場合には何れも、“S”の 1: 2 Mill.迄(最初から食塩水を「メジウム」として行つた〔A〕実験列の溶血限界濃度= 1: 5 Mill.迄とは行かないが)溶血効果が再現しているに対し、

β) 後者にあつては“S”の濃度が 1: 200, 000 以下全管に亘つて全然溶血が起つていない。

等の諸関係に於て、第 I 項第1表の実験に於け

ると大体其の軌を一にしているもののある事が看取されよう。然し此の成績を“S”が食塩水溶液状態で 56°C, 60' に処置されたものでは、全管に於て“S”の完全不活性化が起つているという対照実験の成績に照合するに於ては、茲に血清の存在が“S”の熱非働化に対し阻止的に影響している事を認め得るのである。然し茲に留意すべきはこの第3表の成績は蛋白反応陽性の A-I-Streptolysinfrac-tion を以つて得られたものであるから、少くとも此の場合 A-I-Streptolysinfrac-tion に於て不純物として混在する蛋白性物質が上記の実験結果に対し何等意義がないものである事を実証する必要があるという事である。即ちこの間の事を補足すべく、次に A-I-Streptolysinfrac-tion より更に精製度を高めた蛋白反応陰性の I-N-F-Streptolysinfrac-tion を以つて再吟味実験を行つたのである。

即ち第4表はその成績を示したものであつて、こゝでは I-N-F-Streptolysinfraction がより強力溶血性（溶血限界濃度 = 1 : 20 Mill.）であるという以外、各成績に於ける諸般の関係は第3表に於けると同様である。

最後に第5表は I-N-F-Streptolysinfraction を 5,000 倍濃度に食塩水で溶解したものと、同じく I-N-F-Streptolysinfraction を 5,000 倍濃度に〔血清 + 食塩水〕aa 混液に溶解したものとを調製し、夫々に対して、56°C, 60' の処置を施した後、生理的食塩水を「メジウム」とする溶血試験を行つて得た成績である。

即ち本実験では、

1) I-N-F-fraction を食塩水に溶解した原液、並びに〔家兎血清 + 0.85 % 食塩水〕aa 混液に溶解した原液 そのまゝからの溶血試験で

結

本研究は高度活性の精製 Streptolysin S 標品を使用し、本毒素による溶血に及ぼす血清の影響関係を吟味検討したもので、之によつて収め得た知見を要約すれば次の如くである。

1) 血清の“S”溶血抑制作用は血清存在下に於ける“S”の不可逆的不活性化（酵素的）によるものでもなければ、又血清（又はその成

は、何れも 1 : 20 Mill. 液迄溶血が起つてをり、その間何等溶血力価の差異がない、然し、

2) I-N-F の食塩水溶液の 56°C, 60' 処置のものでは、全管に亘つて溶血が起つておらない、即ち陰性成績であり、

3) 而も I-N-F を〔家兎血清 + 食塩水〕aa 混液に溶解し、56°C, 60' の処置を施したものに於ては 1 : 5 Mill. 液迄溶血が起つてゐる、と云う甚だ截然たる成績が得られたのである。

以上の各実験成績を綜合考察するときは結局、血清には“S”の熱による非働化に対し防禦能があり、而もその性能に於て相当顯著であるという論結に到達するのであるが、血清が如何なる機転によつて“S”の易熱性を防禦するかという更につきつめた問題となると尙不明であつて、之は今後の研究に俟つ事とする。

論

分)の直接的化学的反應に基く Streptolysin 分子の破壊によるものでもなく、血清によつて“S”が単に赤血球に対する作働抑圧の状態に置かれているに過ぎない、

2) 血清には Streptolysin S の熱非働化を防禦する能力もある。

文

- 1) 伊藤亮 : 日本薬物学雑誌, 28, 41, 1940.
- 2) 大西淳 : 金大結研年報, 10 (下), 26, 1952.
- 3) 岡本鑑 : 細胞化学シンポジウム, 3, 145, 1954.
- 4) Todd, E. W., : J. Path. Bact., 39, 298, 1934.
- 5) Todd, E. W., Coburn, A. F., and Hill, A. B. : Lancet, 2, 1213, 1939.
- 6) Stollerman, G. H., Bernheimer, A. W., and MacLeod, C. M. : J. Clin. Invest., 29, 1636, 1950. ; Stollerman, G. H., Bernheimer, A. W. : J. Clin. Invest., 29, 1147, 1950.
- 7) Stollerman, G. H., Brodie, B. B., and Steele, J. M. : J. Clin.

献

- Invest., 31, 180, 1952.
- 8) Humphrey, J. H. : Brit. J. Exper. Path., 30, 365, 1949.
- 9) Humphrey, J. H. : Brit. J. Exper. Path., 30, 345, 1949.
- 10) Todd, E. W. : J. Path. Bact., 47, 423, 1938.
- 11) Braun, H. : Zbl. f. Bakt., Orig., 62, 383, 1912.
- 12) M'Leod, J. W. : J. Path. Bact., 16, 321, 1912.
- 13) 金井章次 : 細菌学雑誌, 299, 459, 1920.
- 14) Okamoto, H., Kyoda, S., und Ito, R. : Jap. J. Med. Sci., IV. Pharmacol., 14, 99, 1941.
- 15) Shoin, S. : Jap. J. Exper. Med., 24, 13, 1954.

Table 1.

Inhibition of hemolytic activity of streptolysin-S by serum, and reappear of high hemolytic titre when the mixed solution of streptolysin-S and serum is diluted with physiological saline

10mg of a purified streptolysin-S preparation [A-I-fraction] was dissolved in 10 ml distilled water, i. e., 10 ml aqueous solution of a concentration of 1 : 1,000 A-I-streptolysinfraction									
Hemolysis test (Time of reading in hours)					[C ₁]				
Dilutions of A-I-fraction	Medium used for dilution				Diluted with				
	[A] 0.85% NaCl		[B] Rabbit's serum + 0.85% NaCl		[Rabbit's serum + 0.85% NaCl]				
	(2)	(24)	(2)	(24)					
1: 5,000	###	###	###	###	1: 5,000 A-I-fraction				
1: 10,000	###	###	###	###	1: 10,000 A-I-fraction				
1: 20,000	###	###	++	##	1: 20,000 A-I-fraction				
1: 50,000	###	###	±	+	1: 50,000 A-I-fraction				
1: 100,000	###	###	—	±	1: 100,000 A-I-fraction				
1: 200,000	###	###	—	—					
1: 500,000	###	###	—	—					
1: 1,000,000	###	###	—	—					
1: 2,000,000	##	###	—	—					
1: 5,000,000	+	++	—	—					
1:10,000,000	—	+	—	—					
1:20,000,000	—	—	—	—					
Control [Without strepto- lysin S]	—	—	—	—					

1 ml of 1% washed rabbit's red blood cell suspension was added to 1 ml of the diluted streptolysin-S solution.

indicates complete hemolysis; ##, ++, +, ± indicate partial hemolysis; — indicates no hemolysis. • = not tested

% content of serum in the media
of respective tubes

1* = 25%, 4* = 2.5%
2* = 10%, 5* = 1%
3* = 5%, 6* = 0.5%

Table 2.

A parallel hemolysis experiment with a solution of 1 : 100,000 streptolysin-S in 50% serum-saline and a solution of 1 : 100,000 streptolysin-S in saline

Original solution of streptolysin-S [A-I]	Hemolysis test, in which 0.85% NaCl solution was used as the diluent									
	(Time of reading in hours)	Dilutions of A-I-fraction								Control
		1: 200,000	1: 500,000	1: 1,000,000	1: 2,000,000	1: 5,000,000	1: 10,000,000	1: 20,000,000	1: 20,000,000	
1 ml of a solution of 1: 100,000 streptolysin-S in a mixture of (Rabbit's serum + 0.85% NaCl)aa	(2)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	(24)	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 ml of a solution of 1: 100,000 streptolysin-S in saline	(2)	##	##	##	++	+	—	—	—	—
	(24)	##	##	##	##	++	+	+	—	—

% content of streptolysin-S [A-I] in the media of respective tubes.

$\left\{ \begin{array}{l} 1* = 25\%, \\ 2* = 10\%, \\ 3* = 5\%, \end{array} \right. \quad \begin{array}{l} 4* = 2.5\% \\ 5* = 1\% \\ 6* = 0.5\% \end{array}$

10 mg of a purified streptolysin-S preparation [A-I-fraction] was dissolved in 10 ml distilled water, i.e., 10 ml aqueous solution of a concentration of 1: 1,000 A-I-streptolysininfraction

Hemolysis test (Reading taken after 24 hours)			[C ₁] Diluted with [Rabbit's serum + 0.85% NaCl] aa	After heating at 56°C for 60 minutes, the content of each tube was serially diluted with 0.85% NaCl	[C ₂] Hemolysis test. in which 0.85% NaCl solution was used as the diluent (Reading taken after 24 hours)												
Dilutions of A-I-fraction	Medium used for dilution				Dilutions of A-I-fraction												
	[A] 0.85% NaCl	[B] [Rabbit's serum + 0.85% NaCl] aa			1 : 10,000	1 : 20,000	1 : 50,000	1 : 100,000	1 : 200,000	1 : 500,000	1 : 1,000,000	1 : 2,000,000	1 : 5,000,000	1 : 10,000,000	1 : 20,000,000	Control (Without streptolysin S)	
1: 5,000	###	###	1 ml of 1: 5,000 A-I-fraction	→	###	###	###	###	##	++	+	+	-	-	-	-	
1: 10,000	###	###	1 ml of 1: 10,000 A-I-fraction	•													
1: 20,000	###	###	1 ml of 1: 20,000 A-I-fraction	→	•	•	###	###	##	++	++	+	-	-	-	-	
1: 50,000	###	##	1 ml of 1: 50,000 A-I-fraction	•													
1: 100,000	###	±	1 ml of 1: 100,000 A-I-fraction	→	•	•	•	•	-	-	-	-	-	-	-	-	
1: 200,000	###	-	Control	1 ml aqueous solution of 1 : 1,000 A-I-fraction was heated at 56°C. for 60 minutes, and then serially diluted with 0.85% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1: 500,000	###	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1: 1,000,000	###	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1: 2,000,000	##	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1: 5,000,000	+	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1:10,000,000	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
1:20,000,000	-	-			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Control [Without streptolysin S]	-	-															

Table 3.
Thermostability of streptolysin-S in the presence of serum (Experimented with A-I-streptolysininfraction)

10 mg of a purified streptolysin-S preparation [I-N-F-fraction] was dissolved in 10 ml distilled water, i. e., 10 ml aqueous solution of a concentration of 1: 1,000 I-N-F-streptolysininfraction

Table 4.
Thermostability of streptolysin-S in the presence of serum
(Experimented with I-N-F-streptolysininfraction)

Hemolysis test (Reading taken after 24 hours)			[C ₁] Diluted with [Rabbit's serum + 0.85% NaCl] aa	After heating at 56°C for 60 minutes, the content of each tube was serially diluted with 0.85% NaCl	[C ₂] Hemolysis test, in which 0.85% NaCl solution was used as the diluent (Reading taken after 24 hours)													
Dilutions of I-N-F-fraction	Medium used for dilution				Dilutions of I-N-F-fraction													
	[A] 0.85% NaCl	[B] [Rabbit's serum + 0.85% NaCl] aa			1: 10,000	1: 20,000	1: 50,000	1: 100,000	1: 200,000	1: 500,000	1: 1,000,000	1: 2,000,000	1: 5,000,000	1: 10,000,000	1: 20,000,000	1: 50,000,000	1: 100,000,000	1: 200,000,000
1 : 5,000	###	###	1 ml of 1: 5,000 I-N-F-fraction	—————→	###	###	###	###	###	###	###	##	+	—	—	—	—	—
1 : 10,000	###	###	1 ml of 1: 10,000 I-N-F-fraction	•														
1 : 20,000	###	###	1 ml of 1: 20,000 I-N-F-fraction	—————→	•	•	###	###	###	###	###	##	+	—	—	—	—	—
1 : 50,000	###	##	1 ml of 1: 50,000 I-N-F-fraction	•														
1 : 100,000	###	++	1 ml of 1:100,000 I-N-F-fraction	—————→	•	•	•	•	++	+	+	±	—	—	—	—	—	—
1 : 200,000	###	±	1 ml of 1:200,000 I-N-F-fraction	•														
1 : 500,000	###	—	1 ml of 1:500,000 I-N-F-fraction	—————→	•	•	•	•	•	—	—	—	—	—	—	—	—	—
1 : 1,000,000	###	—	Control	1 ml aqueous solution of 1: 5,000 I-N-F-fraction was heated at 56°C. for 60 minutes, and then se- rially diluted with 0.85% NaCl														
1 : 2,000,000	###	—																
1 : 5,000,000	##	—																
1 : 10,000,000	++	—																
1 : 20,000,000	±	—																
1 : 50,000,000	—	—																
1 :100,000,000	—	—																
[Control Without streptolysin-S]	—	—																

Table 5.

Showing the protection by serum of streptolysin-S against thermal inactivation

Original streptolysin-S solution		4 ml aqueous solution of a concentration of 1: 1,000 I-N-F-streptolysin fraction			
Further treatments of the original streptolysin-S solution	To 1 ml of the original solution, 4 ml of 0.85% NaCl was added		To 1 ml of the original solution, 4 ml of [rabbit's serum + 0.85%NaCl] aa		
	2 ml	3 ml was heated at 56°C for 60 minutes	2 ml	3 ml was heated at 56°C for 60 minutes	
	Hemolysis test, in which 0.85% NaCl solution was used as the diluent (Reading taken after 24 hours)				
Dilutions of streptolysin-S [I-N-F]	1: 10,000	###	--	###	###
	1: 20,000	###	—	###	###
	1: 50,000	###	—	###	###
	1: 100,000	###	—	###	###
	1: 200,000	###	—	###	###
	1: 500,000	###	—	###	##
	1: 1,000,000	###	—	###	##
	1: 2,000,000	###	—	###	++
	1: 5,000,000	###	—	###	+
	1: 10,000,000	++	—	++	—
	1: 20,000,000	+	—	+	—
	1: 50,000,000	—	—	—	—
	1: 100,000,000	—	—	—	—
Control	—	—	—	—	